

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-365210

(P2002-365210A)

(43) 公開日 平成14年12月18日 (2002. 12. 18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
G 0 1 N 21/27		C 0 1 N 21/27	B 2 G 0 4 5
33/483		33/483	C 2 G 0 5 9
33/543	5 9 5	33/543	5 9 5
// G 0 1 N 37/00	1 0 2	37/00	1 0 2

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2001-174980 (P2001-174980)

(22) 出願日 平成13年6月11日 (2001. 6. 11)

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72) 発明者 竹井 弘之

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

株式会社日立製作所ライフサイエンス推進
事業部内

(72) 発明者 ヒメルハウス ミヒャエル

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(74) 代理人 100075096

弁理士 作田 康夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体分子検出方法

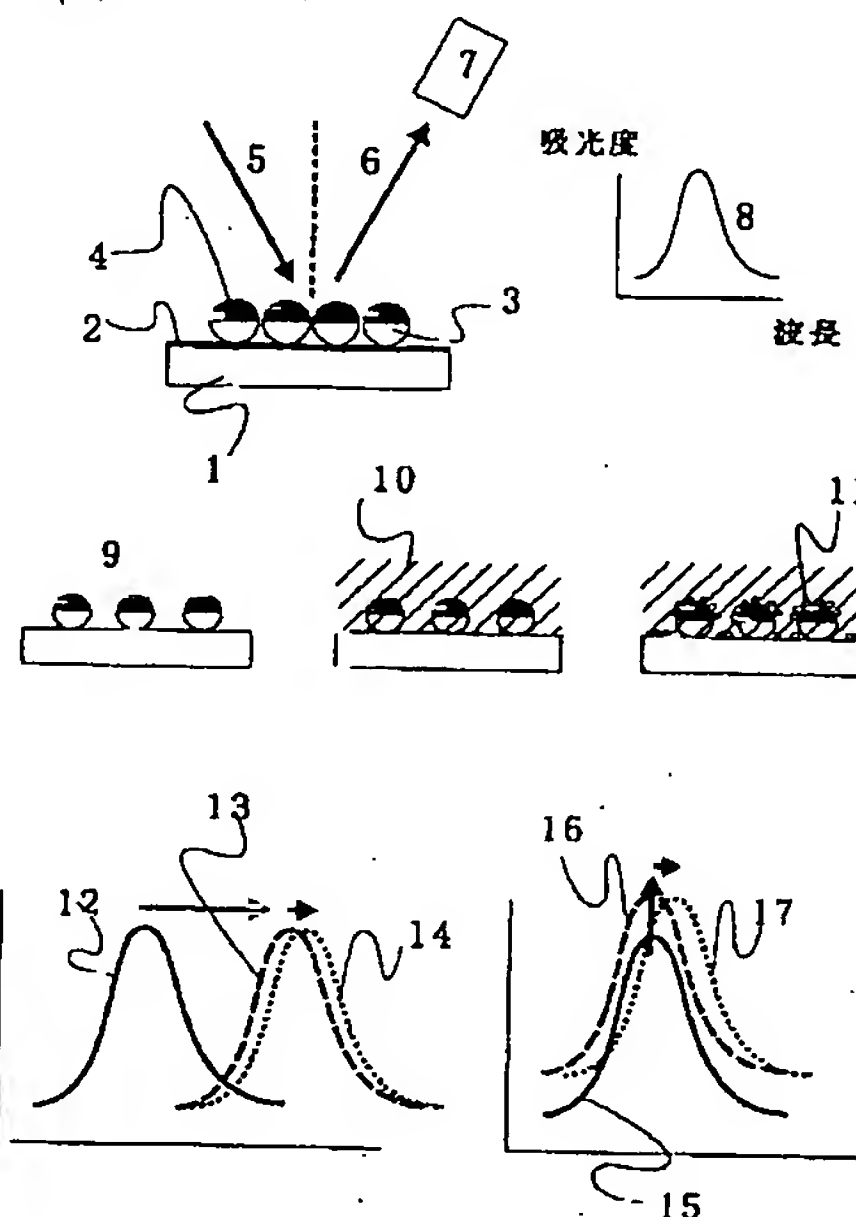
(57) 【要約】

【課題】 液体中における生体分子結合を簡便に測定する装置を提供する。

【解決手段】 貴金属微粒子3, 4が固相された基板1, 2を特定角度から光5を照射し、正反射光6の吸収極大波長を求める。

【効果】 高感度で、温度および濃度変動等による液体の屈折率変動の影響を受けない簡素化されたセンサを構成できる。

図 1



【特許請求の範囲】

【請求項1】基板、貴金属薄膜、誘電体微粒子、貴金属微粒子から構成された光学多層膜の光学特性を利用した光学式分子吸着検出装置において、光学多層膜に分子吸着が生じた際には光学多層膜の反射スペクトルの吸収極大波長がシフトするが、光学多層膜が浸されている液体の屈折率変動に対しては反射スペクトルの吸収極大波長が屈折率1ユニットあたり1000nm以下で、分子吸着を検出することを特徴とする生体分子検出方法。

【請求項2】前記吸収極大波長が屈折率1ユニットあたり300nm以下で分子吸着を検出することを特徴とする請求項1記載の生体分子検出方法。

【請求項3】基板と、貴金属薄膜と、粒径が90nmから125nmのポリスチレン微粒子又はSiO₂微粒子と、厚さ15nmから25nmの金とを有するセンサに、入射角度25度から45度でS偏向光を照射した際に正反射光を分光することにより得られる反射スペクトルの吸収極大波長を測定することにより、分子吸着を検出することを特徴とする生体分子検出方法。

【請求項4】基板と、貴金属薄膜と、粒径が60nmから125nmのポリスチレン微粒子又はSiO₂微粒子と、厚さ8nmから15nmの金とから構成されるセンサに、入射角度45度から65度でS偏向光を照射した際に生じる正反射光を分光することにより得られる反射スペクトルの吸収極大波長を測定することにより、分子吸着を検出することを特徴とする生体分子検出方法。

【請求項5】基板と、貴金属薄膜と、粒径が125nmから145nmのポリスチレン微粒子又はSiO₂微粒子と、厚さ8nmから25nmの金とから構成されるセンサに、入射角度35度から55度でS偏向の光を照射した際に生じる正反射光を分光することにより得られる反射スペクトルの吸収極大波長を測定、分子吸着を検出することを特徴とする生体分子検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、標識を必要としない免疫診断センサ、DNAチップ、蛋白チップおよびこれを利用した測定方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来のこの種のセンサとしては、表面プラズモン共鳴現象を利用したセンサが挙げられる。表面プラズモンとは、金属薄膜と誘電体の界面を伝播する自由電子の疎密波であり、界面における誘電率に大きく影響されることから、免疫センサ、ガスセンサなどの検出原理として用いられている。このセンサを応用した測定装置の具体的な構造例を図2に示す。プリズムなどの透明な高屈折率担体21の表面に約50nmの金もしくは銀などの自由電子金属の薄膜22が形成され、薄膜22の上には分子認識層23が形成されている。薄膜22の表面における表面プラズモンを励起するためにプリズム側か

らp偏向の単色平行光24を光源25から照射する。全反射する条件のもとで入射角度26を変化させながら、正反射光27を検出器28で検出することにより、表面プラズモンの励起が確認できる。すなわち、表面プラズモンが励起される共鳴入射角度29においては、入射光のエネルギーが表面プラズモン励起に消費されるため、反射光の強度30が極度に減少する。分子認識層23にターゲット生体分子が捕捉されている際には、共鳴入射角度31において反射光の強度32が極度に減少するようになる。共鳴角度は界面から数100nm以内の領域における誘電率に敏感に依存することから、共鳴角度を測定することによりセンサとして利用できる。たとえば、分子認識層23中に特定の分子を認識する構造を作っておき、特定の分子の結合により屈折率が変化すると、共鳴入射角度が変化することから分子が捕らえられたことを知ることができる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】上記従来技術の表面プラズモン共鳴センサを利用した測定装置において、反射光は分子認識層における分子吸着のみならず、分子が分散されている緩衝液等の屈折率にも依存する。実際、センサ表面においては液体の質量の方が吸着分子の質量よりも圧倒的に大きく、液体の屈折率が変動するとスペクトル33は大きくシフトし、共鳴入射角度は34となる。このため、分子吸着に伴う信号を検出するためには、液体の温度変動および濃度変動を極力低減する必要がある。具体的には表面プラズモン共鳴センサの表面に10pg/mm²の分子が吸着すると一般的に共鳴入射角度が0.001度シフトし、液体の屈折率が0.1変化すると吸収極大の波長は3度シフトする。したがって液体が水である場合、屈折率は室温において1度につき0.000132変化するため、温度変動が0.25度であれば、吸収極大は同じく0.001度シフトしてしまうことから温度を0.1度以上の精度で制御する必要性が生じる。また、別のタイプの表面プラズモン共鳴センサ表面においては白色光を照射し、正反射光を分光することにより吸収極大の波長でモニターすることも可能である。その場合、10pg/mm²の分子が吸着すると0.1nmシフトし、液体の屈折率が0.1変化すると吸収極大の波長は300nmシフトする。したがって液体が水である場合、屈折率は室温において1度につき0.000132変化するため、温度変動が0.25度であれば、吸収極大は同じく0.1nmシフトしてしまうことから温度を0.1度以上の精度で制御する必要性が生じる。どちらの方法にせよ、生体分子吸着においては緩衝液を置換する必要性が生じるが、その際生じる変動を抑えることは基本的に不可能であるため、リファレンスと比較する必要性が生じる。

【0004】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するために、発明者らが発明した方法により調製された貴金属微粒子の光学現象を利用するものである。基板1、貴金属

薄膜2、誘電体微粒子3、貴金属微粒子4の4層から構成された光学多層膜に光5を照射し、正反射光6を分光光度計7により分光すると顕著なピークを有する吸収スペクトル8が得られる。光学多層膜表面における屈折率に応じて吸収スペクトルが変化する点においては、上記の表面プラズモン共鳴センサと類似している。しかし、表面プラズモン共鳴センサとは異なり、分子吸着に伴うスペクトル変化と液体の屈折率変化によるスペクトル変化を分離することが可能である。上記の系におけるスペクトルは、センサ表面に接する媒体の屈折率および表面での分子吸着に伴い変化し、一般に吸収極大波長は長波長側にシフトする。すなわち空気9と接しているセンサにおいて、空気9を水などの液体10で置換すると、吸収スペクトルは12から13の様に变化する。さらに、液体中の分子11が吸着すると、吸収スペクトルは14の様にさらにシフトする。ここで、従来の吸収極大波長のシフト量は、屈折率が1ユニット変わると3000nmから8000nm変化する。しかし、誘電体微粒子の粒径、金の厚さ、照射角度、照射光の偏向などの特定条件下においては、次の様な現象が観察される。光学基板上の空気9が液体10に置換されると、吸収スペクトルから15から16の様に变化する。すなわち吸光度は変化するが、吸収極大波長はほとんどシフトしない。さらに分子11が吸着すると、今度は吸収極大波長は17で示される様にシフトする。したがって、この様な特定条件で吸収極大波長をモニターしていれば、分子吸着のみを検出することが可能になる。上記の吸収極大波長は屈折率が1ユニット変わると1000nm以下のシフトである。また、好ましくは、300nm以下である。この現象は金微粒子の構造から起因し、空気が液体により置換される場合、もしくは液体が異なる屈折率の液体で置換される場合には、微粒子周辺全体において屈折率が変化するが、貴金属微粒子表面に分子が吸着する場合には、微粒子の片面のみで屈折率変化が生じる。この様に微粒子周辺における屈折率分布の変化が異なる場合には、吸収スペクトルの応答が異なることがありうる。本発明の金微粒子試料を、基板上的連続金薄膜と誘電体微小球上の金微粒子から構成される光共振器をみなすことができる。光共振器を液体に浸すと、共振器の内部または外部において屈折率が変化し、吸収波長ピークをそれぞれ長波長または短波長側にシフトする影響をあたえる。シフトの絶対量が同じ場合には、シフトが完全に相殺される。それに対して、分子吸着は金表面の近傍のみで生じ、これに伴い生じるシフトは常に長波長側となる。実データを図3Aに示す。粒径が110nmのポリスチレン微粒子に厚さ20nmの金を蒸着し、基板から0度の方向から照射した際得られたスペクトルである。40は空気中におけるスペクトル、41はエタノール（屈折率1.36）で置換された場合のスペクトルである。さらにエタノールに懸濁されたオクタデカンチオール分子が金表面

に自己組織的に単分子層を形成するとスペクトルは42となる。ここでは、オクタデカンチオール分子は表面におけるモデル吸着分子として用いられている。同じ試料を入射角度35度でS偏向の白色光で照射した際得られたスペクトルを図3Bに示す。空気中でのスペクトルが43、エタノールで置換後のスペクトルが44、オクタデカンチオールの自己組織的単分子膜形成後のスペクトルが45である。スペクトル43と44では、吸収極大波長はシフトしていないが、45は明らかにシフトしていることが判る。この条件で測定することの利点を図4に示す。生体分子の吸着を測定するにあたってしばしば緩衝液を置換する必要がある。ここでは緩衝液Aを緩衝液Bで置換し、さらに生体分子が懸濁された緩衝液B'で置換する場合を想定し、この置換作業に伴って生じるセンサ応答特性を従来のセンサと本発明におけるセンサについて示す。まず本発明のセンサの構造であるが微細流路60の底には貴金属微粒子61が形成されている。貴金属微粒子61の表面には抗体、DNAフラグメント、レセプターが固相化されており、微細流路60から導入される液体サンプル中に含まれる抗原、DNAフラグメント、リガント等を選択的に捕捉する様になっている。結合により生じる貴金属微粒子の反射スペクトル変化を観察するために、微細流路60の上部から挿入されているマルチモード光ファイバー62を介して、白色光63が照射される。マルチモード光ファイバー62の挿入角度は一定の値とし、先端の装着されている偏光子64により照射される白色光はS偏光である。正反射した光65は別なマルチモード光ファイバー66により分光光度計に導かれ、吸収極大波長が測定される。上記センサと従来の表面プラズモン共鳴センサとの応答特性の違いを、67と68で示す。67は表面プラズモン共鳴センサにおいてはセンサグラムとして知られ、横軸は時間、縦軸は反射スペクトルの共鳴入射角度である。68においては横軸は時間で、縦軸は本発明における貴金属微粒子の極大吸収波長である。時間69において緩衝液Aを屈折率が異なる緩衝液Bで置換すると、従来のセンサにおいては信号が変化するが、本発明のセンサは液体の屈折率変化には応答しない。さらに時間70において緩衝液Bを生体分子の含む緩衝液B'で置換すると、従来型センサと本発明におけるセンサは両方とも応答する。ただし、従来型センサは生体分子の吸着に伴う変化のみならず、温度および濃度の違いなどから生じる緩衝液Bと緩衝液B'間のごく僅かな屈折率の変動に対しても応答している。すなわち時間70以降の応答71は分子吸着に伴う応答72と緩衝液による応答が重なっている。しかし本発明におけるセンサは純粋に生体分子吸着にみに応答する。そこで例えば、粒径が90nmから125nmのポリスチレン微粒子およびSiO₂微粒子を誘電体微粒子として用い、厚さ15nmから25nmの金の薄膜として用い、入射角度25度から45度でS偏光光を照射した際に生じる

正反射光を分光した場合、液体の屈折率が変化しても吸収極大波長は変化しないが、金表面に選択的に分子が吸着した場合には、吸収極大波長が変化する。また粒径が60nmから125nmのポリスチレン微粒子および SiO_2 微粒子を誘電体微粒子として用い、厚さ8nmから15nmの金を貴金属薄膜として用い、入射角度45度から65度でS偏光光を照射した際に生じる正反射光を分光した場合、液体の屈折率が変化しても吸収極大波長は変化しないが、金表面に選択的に分子が吸着した場合には、吸収極大波長が変化する。さらに粒径が125nmから145nmのポリスチレン微粒子および SiO_2 微粒子を誘電体微粒子として用い、厚さ8nmから25nmの金を貴金属薄膜として用い、入射角度35度から55度でS偏光光を照射した際に生じる正反射光を分光した場合、液体の屈折率が変化しても吸収極大波長は変化しないが、金表面に選択的に分子が吸着した場合には、吸収極大波長が変化する。貴金属微粒子の構造に関しては、分子、 SiO_2 、 TiO_2 等の微粒子を一層形成し、金、銀、銅、白金等の貴金属を蒸着もしくはスパッタすることにより、微粒子の上に金、銀、銅、白金等の帽子状微粒子が形成できる（特開平11-1703）。貴金属微粒子が形成されたことにより、基板が顕著な発色を示す様になる（特開平10-339808）。この発色現象は、白色光が反射される際に、一部の波長帯域の光が吸収されることにより生じる。上記貴金属微粒子の吸収ピーク波長は表面の屈折率に依存するため、表面における屈折率が変化する様な反応を検出する原理として利用でき（特開平11-326193）、また表面を抗体およびDNA等特異的吸着能を有する生体分子で修飾することにより、バイオセンサとして利用できる（特開2000-55920）。本特許出願は、上記バイオセンサに対する液体の屈折率の影響を極力低減するものである。液体の屈折率が変化した際に極大吸収波長が変化しないような特性を有する金微粒子を用い、特定角度で照射することにより達成するものである。

【0005】

【発明の実施の形態】（実施例1）本発明の利用形態の一実施例を図5に示す。シリコン基板90の上に厚さ20nmの金が蒸着により形成されている。粒径110nmのポリスチレン微粒子を一層のみ吸着し、その上から金をさらに20nm蒸着することにより、ポリスチレン微粒子の上に金粒子91を形成する。金微粒子91は官能基を有するチオール分子で修飾されており、アミノ基を有する任意の抗体を結合することができる。金微粒子表面で、微量の試料を導入および反応させるため必要な流路92がPMMAで形成されており、金微粒子91を35度の角度で照射するため、ファイバーバンドル93が35角度で挿入されており、先端には偏光子94が装着されている。白色照射光94の正反射光96を拾うために、ファイバーバンドル97挿入されている。正反射光96は分光光度計に導かれ、反射光の吸収極大波長が求められ

る。複数のファイバーバンドルを流路方向に対して、縦もしくは横に方法に配列してもよい。

（実施例2）本発明の利用形態の一実施例を図に示す。ガラス基板100の上に厚さ20nmの金が蒸着により形成されている。粒径80nmのポリスチレン微粒子を一層のみ吸着し、その上から金をさらに10nm蒸着することにより、ポリスチレン微粒子の上に金粒子101を形成する。金微粒子は官能基を有するチオール分子で修飾されており、アミノ基を有する任意の抗体を結合することができる。金微粒子表面で、微量の試料を導入および反応させるため必要な流路がガラス102で形成されている。流路上部にはシリンドリカルレンズ103が配置されており、角度55度の方向から照射される光104が偏光子105を通して金微粒子101に集光される様になっている。正反射光106は分光光度計に導かれ、吸収極大波長が求められる。

（実施例3）本発明の利用形態の一実施例を図に示す。シリコン基板110の上に厚さ20nmの金が蒸着により形成されている。シリコン基板110上の窪み111に粒径135nmのポリスチレン微粒子を一層のみ吸着し、その上から金をさらに10nm蒸着することにより、ポリスチレン微粒子の上に金粒子112を形成する。金微粒子は官能基を有するチオール分子で修飾されており、アミノ基を有する任意の抗体を結合することができる。金微粒子表面で、微量の試料を導入および反応させるため必要な流路がシリコン113で形成されている。金微粒子が形成されている領域の上部には反射鏡114が形成されており、光ファイバー115および偏光子116を介して流路内に導入された光117は、反射鏡114により45度の角度で金微粒子112に反射される。正反射光118は再び反射鏡114により反射され、光ファイバー119を介して分光光度計に導かれ、吸収極大波長が求められる。

【0006】

【発明の効果】本発明により、被検体の有無を高感度で検出できる簡便なセンサ及び検出装置を提供できた。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の装置構成および検出原理を示す図。

【図2】従来技術の装置構成および原理を示す図。

【図3】本発明のセンサにより得られた実データを示す図。

【図4】従来技術と本発明のセンサとの応答特性の比較を示す図。

【図5】貴金属微粒子表面に試料を導入する微細流路の構造と照射方法の例を示す図。

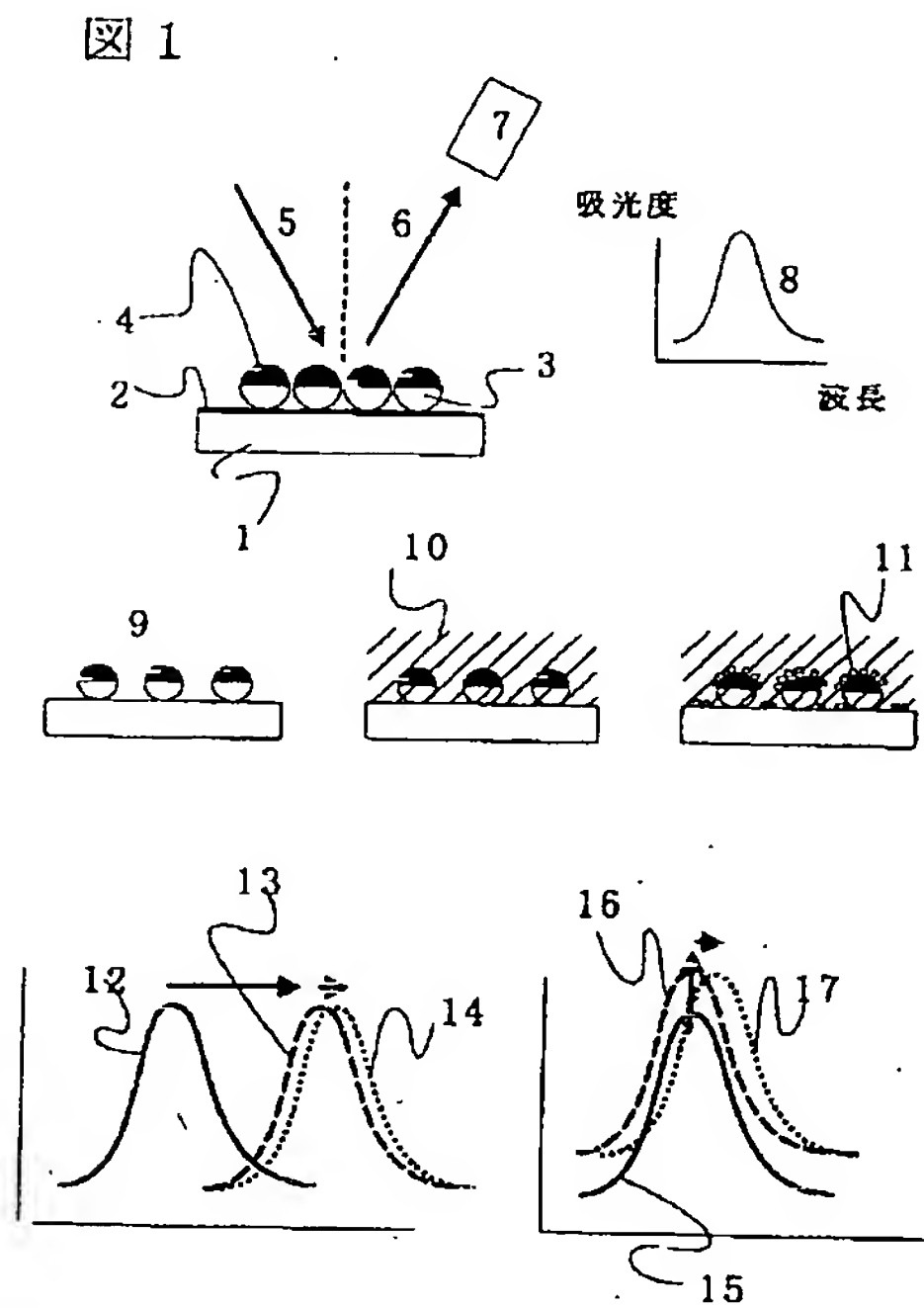
【符号の説明】

1：基板、2：貴金属薄膜、3：誘電体微粒子、4：貴金属微粒子、5：白色光、6：正反射光、7：分光光度計、8：吸収スペクトル、9：空気、10：液体、11：分子、12、13、14、15、16、17：吸収

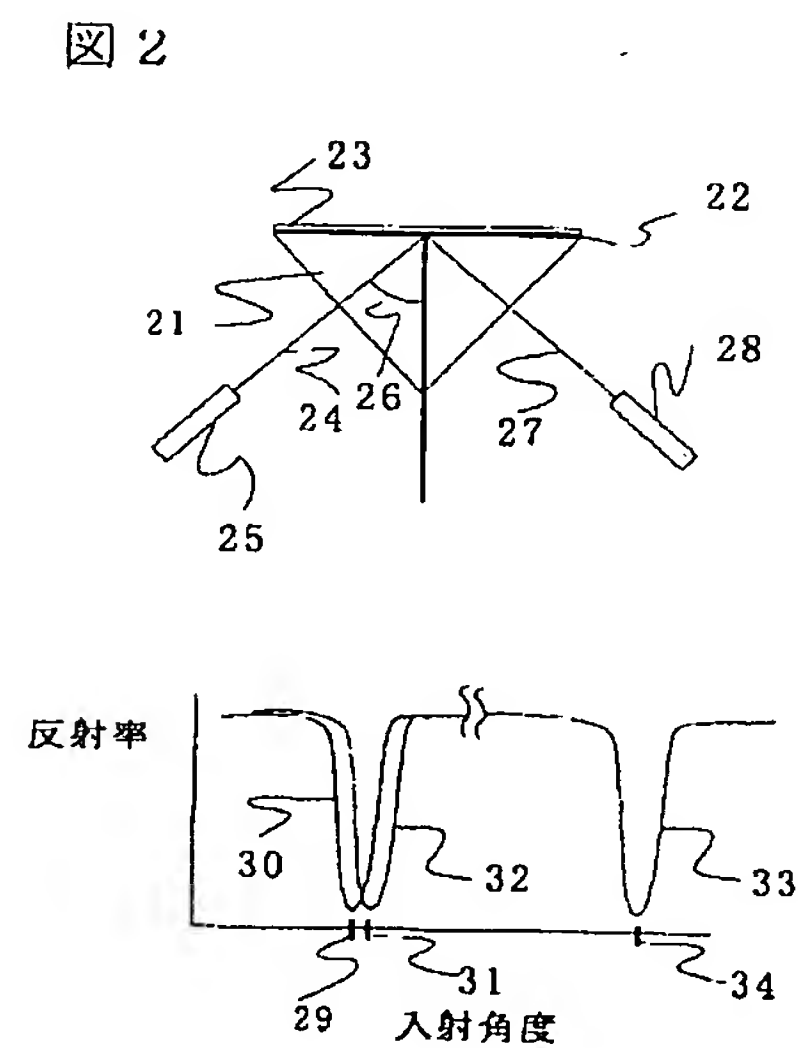
スペクトル、21：高屈折率担体、22：自由電子金属の薄膜、23：分子認識層、24：単色の平行光、25：光源、26：共鳴入射角度、27：正反射光、28：検出器、29：共鳴入射角度、30：入射角度依存性の反射光強度、31：分子吸着に伴って生じた新たな共鳴入射角度、32：反射光強度、33：反射光強度、34：液体の影響により生じた新たな共鳴入射角度、40：空気中における吸収スペクトル、41：エタノール中における吸収スペクトル、42：エタノール中におけるオクタデカンチオール自己組織化膜形成後の吸収スペクトル、43：空気中における吸収スペクトル、44：エタノール中におけるオクタデカンチオール自己組織化膜形成後の吸収スペクトル、60：微細流路、61：貴金属微粒子、62：マルチモード光ファイバー、63：白色光、64：偏光子、65：正反射光、66：マルチ

モード光ファイバー、67：従来型表面プラズモン共鳴センサの応答特性、68：本発明によるセンサの応答特性、69：緩衝液Bによる置換、70：緩衝液B'による置換、71：第二の置換後の応答、72：分子吸着による応答、90：シリコン基板、91：金微粒子、92：流路、93：ファイバーバンドル、94：白色照射、95：偏光子、96：正反射光、97：ファイバーバンドル、100：ガラス基板、101：金微粒子、102：ガラス流路、103：シリンドリカルレンズ、104：照射光、105：偏光子、106：正反射光、110：シリコン基板、111：窪み、112：金微粒子、113：シリコン流路、114：反射鏡、115：光ファイバー、116：偏光子、117：照射光、118：正反射光、119：光ファイバー。

【図1】

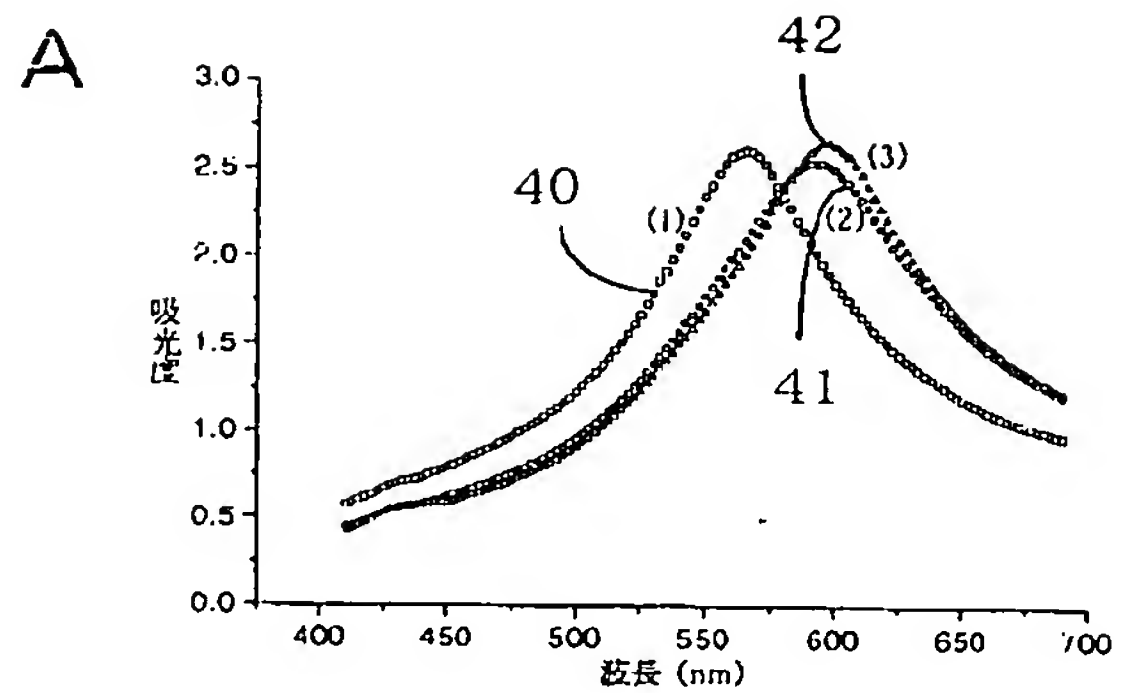


【図2】

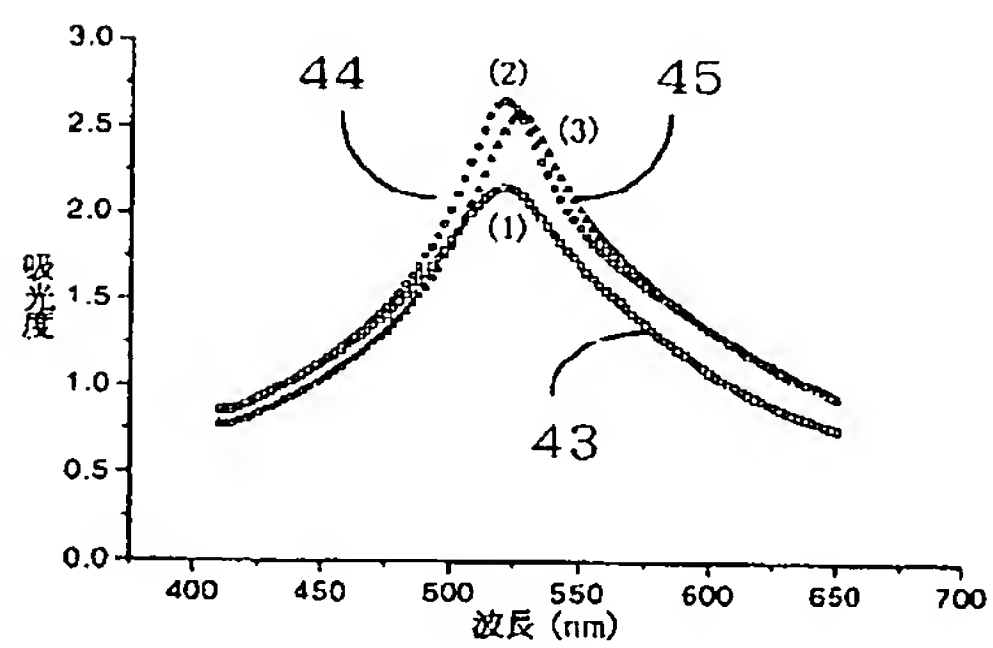


【図3】

図3

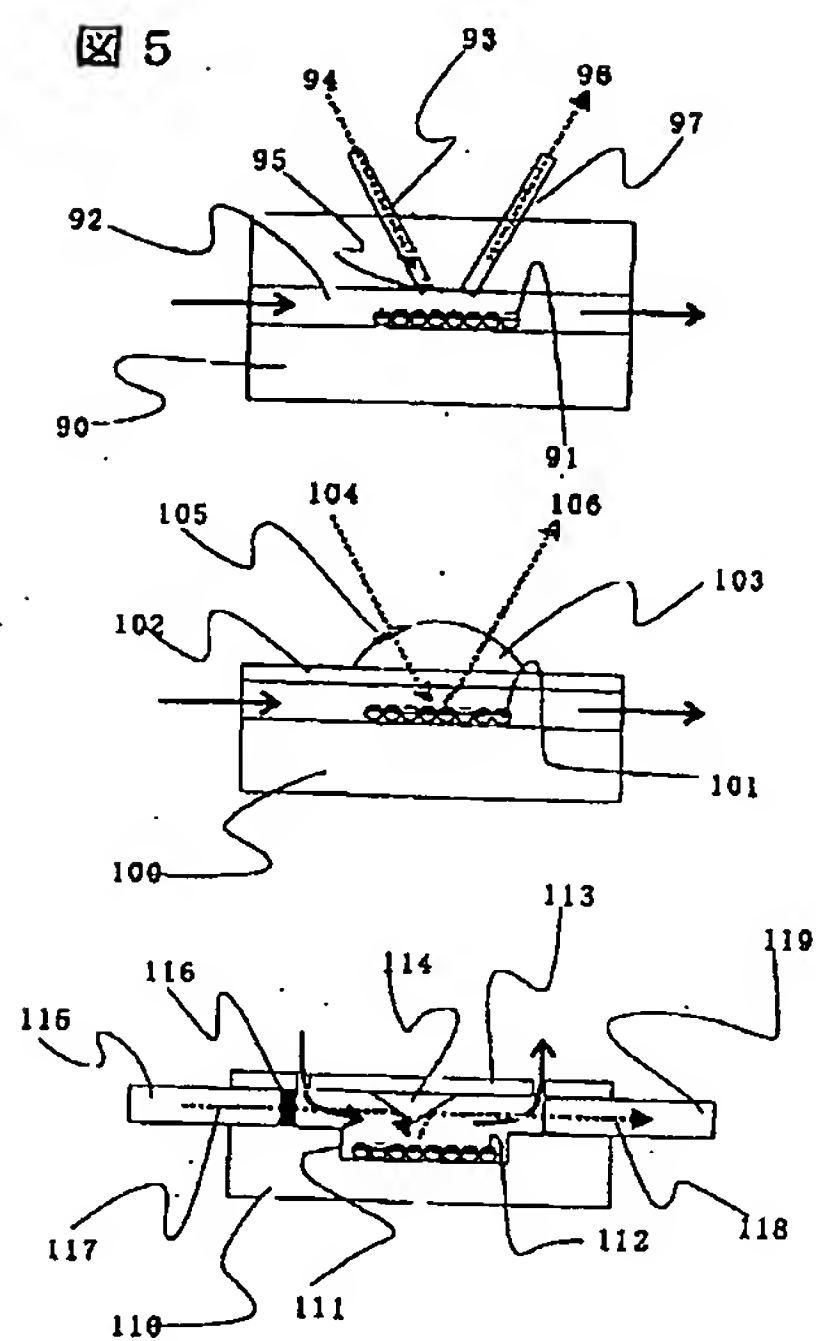


B



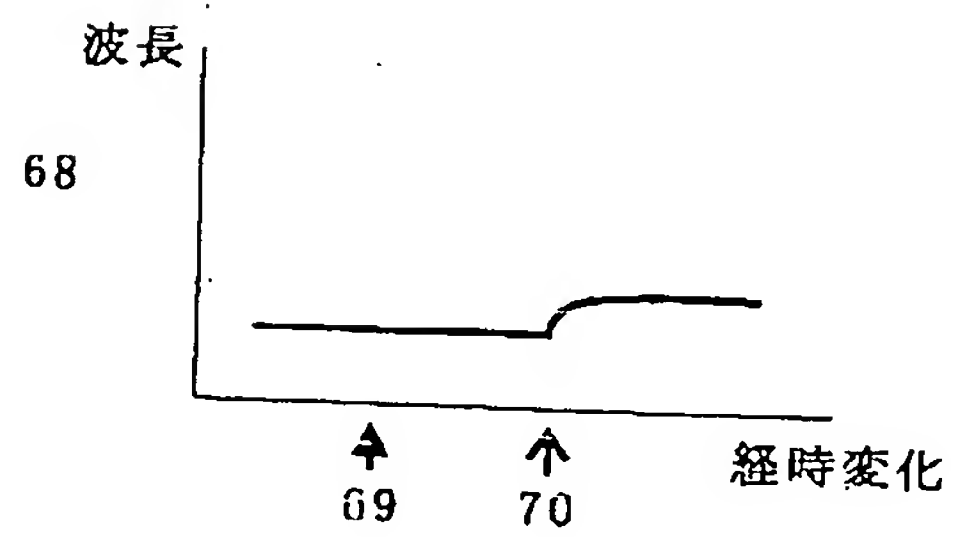
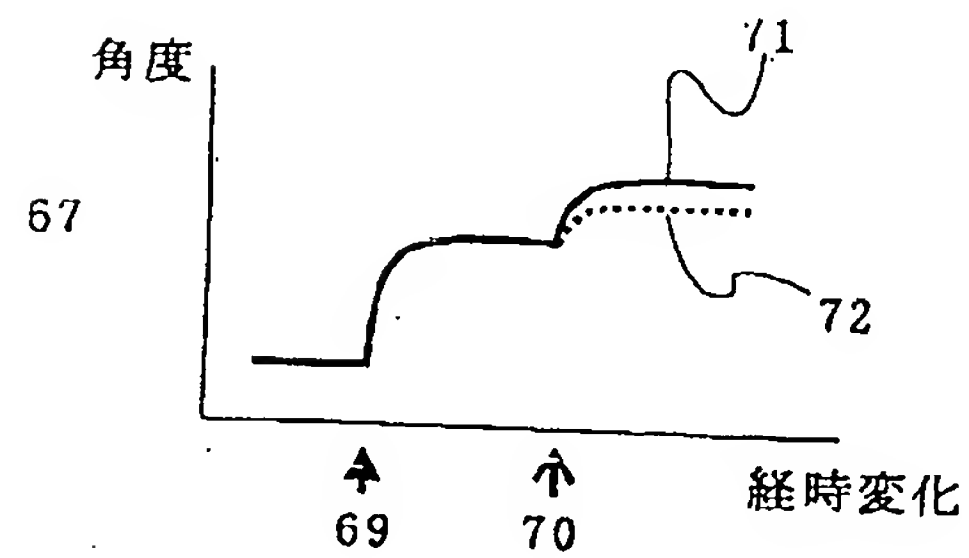
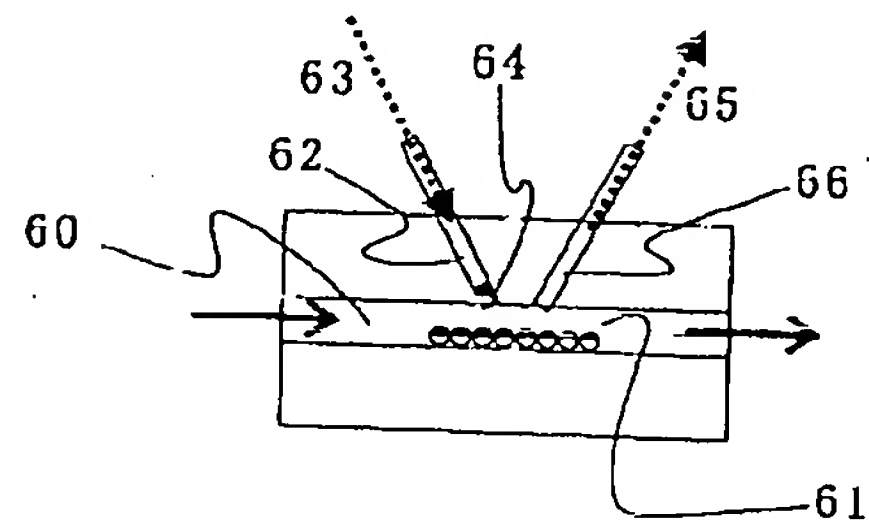
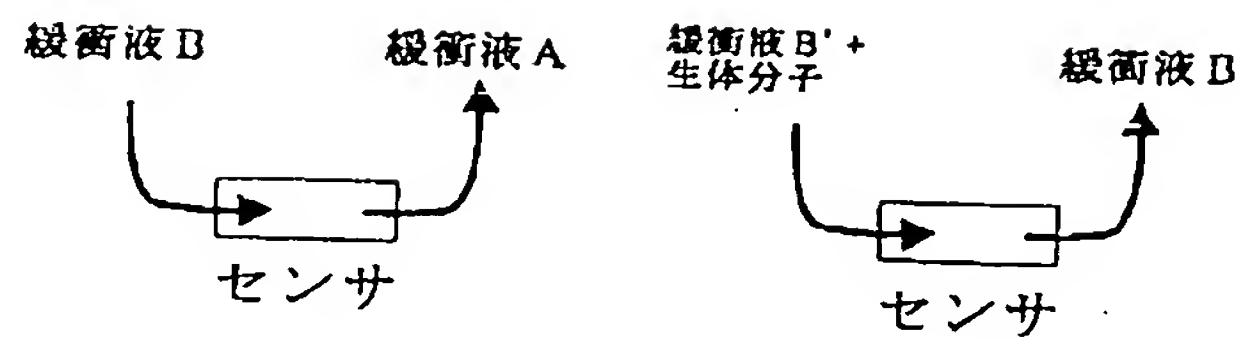
【図5】

図5



【図4】

図 4



フロントページの続き

Fターム(参考) 2G045 FA11 FB15 GC11
2G059 AA05 BB12 CC16 CC17 DD12
DD13 EE02 EE05 EE12 GG10
HH02 JJ11 JJ12 JJ13 JJ17
JJ19

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-365210

(43)Date of publication of application : 18.12.2002

(51)Int.Cl.

G01N 21/27
G01N 33/483
G01N 33/543
// G01N 37/00

(21)Application number : 2001-174980

(71)Applicant : HITACHI LTD

(22)Date of filing : 11.06.2001

(72)Inventor : TAKEI HIROYUKI
HIMMELHAUS MICHAEL

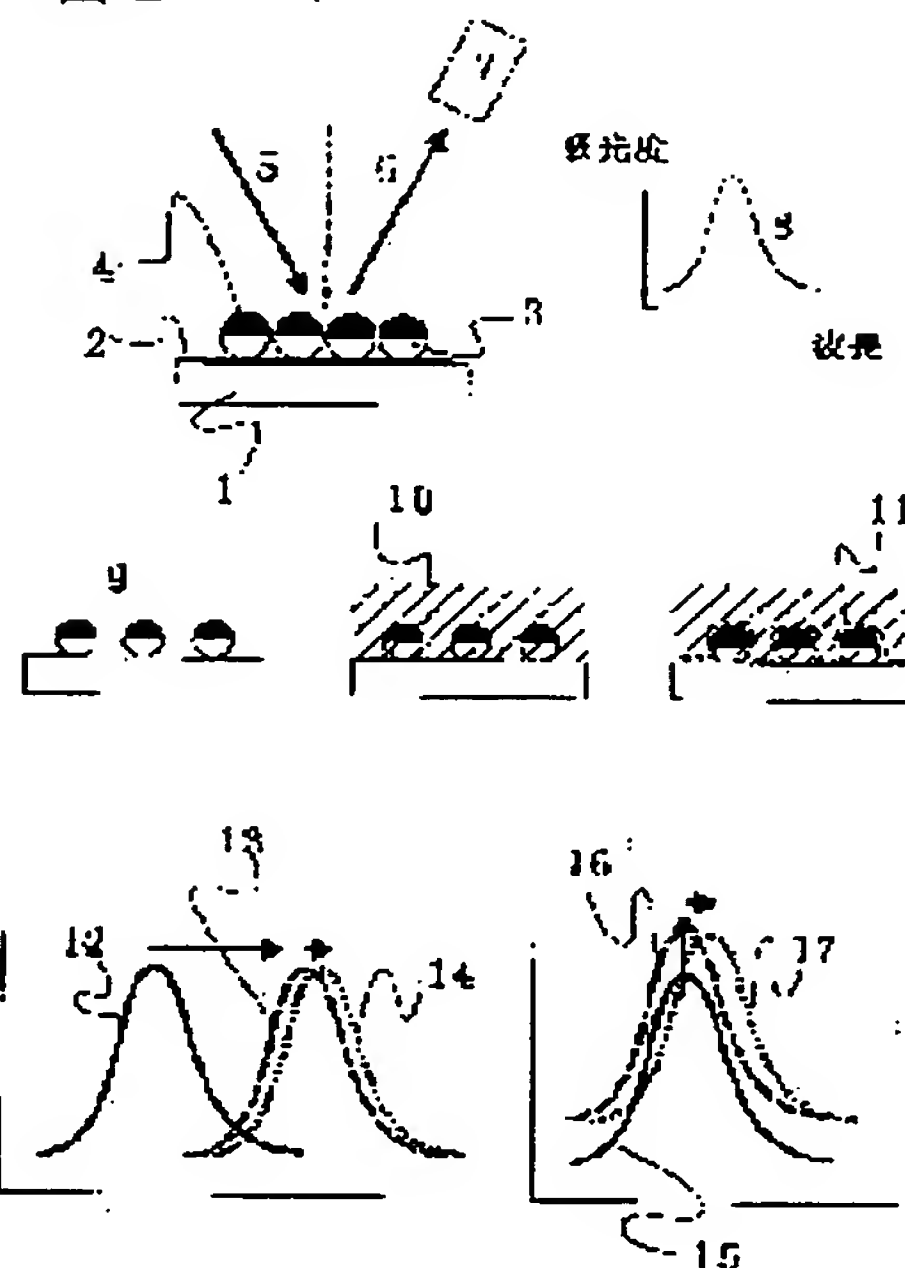
(54) METHOD OF DETECTING LIVING-BODY MOLECULE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an apparatus by which a living-body molecular bond in a liquid is measured simply.

SOLUTION: Substrates 1, 2 to which noble-metal fine particles 3, 4 are solid-phased are irradiated with light 5 from a specific angle, and the absorption maximum wavelength of specularly reflected light 6 is found. Consequently, a sensor which is of high sensitivity and which is not influenced by a change in the refractive index of the liquid due to a temperature, a concentration change and the like can be constituted.

図 1



CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The biomolecule detection approach which the absorption-maximum wavelength of a reflectance spectrum be 1000 nm or less per refractive-index 1 unit, and be characterized by to detect molecular adsorption to refractive-index fluctuation of the liquid in which optical multilayers be dip although the absorption-maximum wavelength of the reflectance spectrum of optical multilayers shift in the optical molecular adsorption detection equipment using the optical property of the optical multilayers which consisted of the substrate, a noble-metals thin film, a dielectric particle, and a noble-metals particle when molecular adsorption arise in optical multilayers.

[Claim 2] The biomolecule detection approach according to claim 1 characterized by said absorption-maximum wavelength detecting molecular adsorption by 300nm or less per refractive-index 1 unit.

[Claim 3] The biomolecule detection approach characterized by detecting molecular adsorption by measuring the absorption-maximum wavelength of the reflectance spectrum obtained by carrying out the spectrum of the specular reflection light when S deviation light is irradiated at 25 to 45 degrees whenever [incident angle] at a substrate, a noble-metals thin film, and the sensor by which particle size has a 90 to 125nm polystyrene particle or SiO₂ particle, and 15 to 25nm gold. [in thickness]

[Claim 4] The biomolecule detection approach characterized by detecting molecular adsorption by measuring the absorption-maximum wavelength of the reflectance spectrum obtained by carrying out the spectrum of the specular reflection light produced when S deviation light be irradiated at 45 to 65 degrees whenever [incident angle] at a substrate, a noble-metals thin film, and the sensor by which particle size consist of a 60 to 125nm polystyrene particle or SiO₂ particle, and 8 to 15nm gold. [in thickness]

[Claim 5] The biomolecule detection approach characterized by measure the absorption maximum wavelength of the reflectance spectrum obtain by carry out the spectrum of the specular reflection light produce when the light of S deviation be irradiate at 55 degrees from 35 degrees whenever [incident angle] in a substrate, a noble metals thin film, and the sensor by which particle size consist of a 125 to 145nm polystyrene particle or SiO₂ particle, and 8 to 25nm gold, and detect molecular adsorption in them. [in thickness]

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the measuring method using the immunodiagnosis sensor which does not need an indicator, a DNA chip, a protein chip, and this.

[0002]

[Description of the Prior Art] As this conventional kind of a sensor, the sensor using a surface plasmon resonance phenomenon is mentioned. Surface plasmon is the wave of expansion of the free electron which spreads the interface of a metal thin film and a dielectric, and since it is greatly influenced by the dielectric constant in an interface, it is used as detection principles, such as an immune sensor and a gas sensor. The concrete example of structure of the measuring device adapting this sensor is shown in drawing 2. The thin film 22 of free electron metals, such as about 50nm gold or silver, is formed in the front face of the transparent high refractive-index support 21, such as prism, and the molecular recognition layer 23 is formed on the thin film 22. In order to excite the surface plasmon in the front face of a thin film 22, the monochrome parallel light 24 of p deviation from a prism side is irradiated from the light source 25. Excitation of surface plasmon can be checked by detecting the specular reflection light 27 with a detector 28, changing 26 whenever [incident angle] under the conditions which carry out total reflection. That is, whenever [resonance incident angle / by which surface plasmon is excited], in 29, since the energy of incident light is consumed by surface plasmon excitation, the reinforcement 30 of the reflected light decreases to the degree of pole. When target biomolecule is caught by the molecular recognition layer 23, in 31, the reinforcement 32 of the reflected light comes to decrease to the degree of pole whenever [resonance incident angle]. Since it depends to the dielectric constant in less than several 100nm field sensitively from an interface, a resonance include angle can be used as a sensor by measuring a resonance include angle. For example, if the structure of recognizing a specific molecule is made in the molecular recognition layer 23 and a refractive index changes with association of a specific molecule, since whenever [resonance incident angle] changes, it can know that the molecule was caught.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] In the measuring device using the surface plasmon resonance sensor of the above-mentioned conventional technique, the reflected light is dependent not only on the molecular adsorption in a molecular recognition layer but the refractive index of the buffer solution with which the molecule is distributed. If the mass of a liquid is more overwhelmingly [than the mass of an admolecule] larger in a sensor front face and the refractive index of a liquid is actually changed, a spectrum 33 will be shifted greatly and whenever [resonance incident angle] will be set to 34. For this reason, in order to detect the signal accompanying molecular adsorption, it is necessary to reduce temperature fluctuation and concentration fluctuation of a liquid as much as possible. If the molecule of 2 specifically sticks to the front face of a surface plasmon resonance sensor 10 pg(s)/mm, generally whenever [resonance incident angle] will shift 0.001 degrees, and if the refractive index of a liquid changes 0.1 times, the wavelength of the absorption maximum will be shifted 3 times. Therefore, when a liquid is water, since a refractive index changes 0.000132 times per time in a room temperature, if temperature fluctuation is 0.25 degrees, since ***** is similarly shifted 0.001 degrees, it will need to control temperature by precision of 0.1 degrees or more. Moreover, it is also possible by irradiating the white light in a surface plasmon resonance sensor front face another type, and carrying out the spectrum of the specular reflection light to act as a monitor on the wavelength of the absorption maximum. In that case, if the molecule of 2 adsorbs 10 pg/mm, 0.1nm will be shifted, and if the refractive index of a liquid changes 0.1 times, 300nm of wavelength of the absorption maximum will be shifted. Therefore, when a liquid is water, since a refractive index changes 0.000132 times per time in a room temperature, if temperature fluctuation is 0.25 degrees, since 0.1nm of absorption maximums is similarly shifted, they will need to control temperature by precision of 0.1 degrees or more. which approach -- an imitation -- although it will be necessary to permute the buffer solution in biomolecule adsorption, since it

is fundamentally impossible, suppressing the fluctuation produced in that case will need to compare with a reference.

[0004]

[Means for Solving the Problem] In order to solve the above-mentioned technical problem, the optical phenomena of the noble-metals particle prepared by the approach which artificers invented are used. If light 5 is irradiated at the optical multilayers which consisted of four layers, a substrate 1, the noble-metals thin film 2, the dielectric particle 3, and the noble-metals particle 4, and the spectrum of the specular reflection light 6 is carried out with a spectrophotometer 7, the absorption spectrum 8 which has a remarkable peak will be obtained. In the point that an absorption spectrum changes according to the refractive index in an optical multilayers front face, it is similar with the above-mentioned surface plasmon resonance sensor. However, it is possible to separate the spectrum change by the spectrum change and the refractive-index change of a liquid accompanying molecular adsorption unlike a surface plasmon resonance sensor. The spectrum in the above-mentioned system changes in connection with the molecular adsorption in the refractive index and front face of a medium adjacent to a sensor front face, and, generally absorption-maximum wavelength is shifted to a long wavelength side. That is, in the sensor which is in contact with air 9, if the liquids 10, such as water, permute air 9, an absorption spectrum will change like 12 to 13. Furthermore, if the molecule 11 in a liquid adsorbs, an absorption spectrum will be further shifted like 14. Here, as for the shift amount of the conventional absorption-maximum wavelength, 8000nm of refractive indexes changes from 1 unit ***** and 3000nm. However, the following phenomena are observed under specific conditions, such as a deviation of exposure light, whenever [particle-size / of a dielectric particle /, golden thickness, and illuminating-angle]. If the optical substrate absentminded mind 9 is permuted by the liquid 10, it will change from an absorption spectrum like 15-16. That is, although an absorbance changes, absorption-maximum wavelength is hardly shifted. If a molecule 11 furthermore adsorbs, absorption-maximum wavelength will be shortly shifted to the appearance shown by 17. Therefore, if it is acting as the monitor of the absorption-maximum wavelength on such specific conditions, it will become possible to detect only molecular adsorption. The refractive indexes of the above-mentioned absorption-maximum wavelength are 1 unit ***** and the shift of 1000nm or less. Moreover, it is 300nm or less preferably. When this phenomenon originates from the structure of a golden particle and air is permuted by the liquid, or when the liquid of a refractive index with which liquids differ permutes, a refractive index changes in the whole particle circumference, but when a molecule sticks to a noble-metals particle front face, refractive-index change arises only on one side of a particle. Thus, when change of the refractive-index distribution in the particle circumference differs, the responses of an absorption spectrum may differ. The optical resonator which consists of golden particles on the continuation golden thin film on a substrate and a dielectric minute ball in the golden particle sample of this invention can be regarded. If an optical resonator is dipped in a liquid, a refractive index will change in the interior or the exterior of a resonator, and it will have effect which shifts an absorption wavelength peak to a long wavelength or short wavelength side, respectively. When the absolute magnitude of a shift is the same, a shift is offset completely. The shift which produces molecular adsorption only near the golden front face, and is produced in connection with this always becomes a long wavelength side to it. Live data are shown in drawing 3 A. It is the spectrum obtained when particle size vapor-deposited gold with a thickness of 20nm to the polystyrene particle which is 110nm and irradiated from the direction of 0 times from a substrate. The spectrum [40] in air and 41 are the spectrums at the time of permuting by ethanol (refractive index 1.36). A spectrum will be set to 42 if the OKUTA decane thiol molecule furthermore suspended in ethanol forms a monomolecular layer in a golden front face in self-organization. Here, the OKUTA decane thiol molecule is used as a model admolecule in a front face. The spectrum obtained when the same sample was irradiated according to the white light of S deviation at 35 degrees whenever [incident angle] is shown in drawing 3 B. For the spectrum in the inside of air, the spectrum after a permutation is [the spectrum after self-organization-monomolecular-film formation of 44 and an OKUTA decane thiol] 45 in 43 and ethanol. By spectrums 43 and 44, although absorption-maximum wavelength is not shifted, it

turns out that 45 is shifted clearly. The advantage of measuring on this condition is shown in drawing 4 . In measuring adsorption of biomolecule, it will often be necessary to permute the buffer solution. Here, a sensor [in / for the sensor response characteristic produced with this permutation / the conventional sensor and this invention] is shown supposing the case where the buffer solution B permutes the buffer solution A, and it permutes by buffer-solution B' which biomolecule suspended further. Although it is the structure of the sensor of this invention first, the noble-metals particle 61 is formed in the bottom of the detailed passage 60. The antibody, the DNA fragment, and the receptor are solid-phase-ized by the front face of the noble-metals particle 61, and the antigen contained in the liquid sample introduced from the detailed passage 60, a DNA fragment, RIGANTO, etc. are caught alternatively. In order to observe reflectance spectrum change of the noble-metals particle produced by association, the white light 63 is irradiated through the multimode optical fiber 62 inserted from the upper part of the detailed passage 60. The white light irradiated with the polarizer 64 with which the insertion include angle of a multimode optical fiber 62 is made into a fixed value, and it is equipped with the tip is S polarization. The light 65 reflected regularly is led to a spectrophotometer by another multimode optical fiber 66, and absorption-maximum wavelength is measured. 67 and 68 show the difference in the response characteristic of the above-mentioned sensor and the conventional surface plasmon resonance sensor. 67 is known as a sensor gram in a surface plasmon resonance sensor, an axis of abscissa is time amount and an axis of ordinate is whenever [resonance incident angle / of a reflectance spectrum]. In 68, an axis of abscissa is time amount and an axis of ordinate is the absorption maximum wavelength of the noble-metals particle in this invention. Although a signal will change in the conventional sensor if the buffer solution B with which refractive indexes differ permutes the buffer solution A in time amount 69, the sensor of this invention does not answer refractive-index change of a liquid. If it permutes by buffer-solution B' in which biomolecule furthermore contains the buffer solution B in time amount 70, as for a conventional-type sensor and the sensor in this invention, both will answer. However, the conventional-type sensor has answered also not only to the change accompanying adsorption of biomolecule but to fluctuation of very few refractive indexes between the buffer solution B produced from the difference between temperature and concentration etc., and buffer-solution B'. That is, the response 72 accompanying molecular adsorption in the response 71 after time amount 70 and the response by the buffer solution have lapped. However, the sensor in this invention answers for seeing to biomolecule adsorption purely. It is there, for example, particle size is a 90 to 125nm polystyrene particle, and SiO₂. When the spectrum of the specular reflection light produced when it uses as a thin film of 25nm gold from 15nm in thickness and S polarization light is irradiated at 45 degrees from 25 degrees whenever [incident angle], using a particle as a dielectric particle is carried out, even if the refractive index of a liquid changes, absorption-maximum wavelength does not change, but when a molecule sticks to a golden front face alternatively, absorption-maximum wavelength changes. Moreover, particle size uses a 60 to 125nm polystyrene particle, and SiO₂ particle as a dielectric particle. When the spectrum of the specular reflection light produced when S polarization light is irradiated at 45 to 65 degrees is carried out whenever [incident angle] from 8nm in thickness, using 15nm gold as a noble-metals thin film, Even if the refractive index of a liquid changes, absorption-maximum wavelength does not change, but when a molecule sticks to a golden front face alternatively, absorption-maximum wavelength changes. Furthermore, particle size uses a 125 to 145nm polystyrene particle, and SiO₂ particle as a dielectric particle. When the spectrum of the specular reflection light produced when S polarization light is irradiated at 35 to 55 degrees is carried out whenever [incident angle] from 8nm in thickness, using 25nm gold as a noble-metals thin film, Even if the refractive index of a liquid changes, absorption-maximum wavelength does not change, but when a molecule sticks to a golden front face alternatively, absorption-maximum wavelength changes. About the structure of a noble-metals particle, the particle of a molecule, SiO₂, and TiO₂ grade is formed further, and hat-like particles, such as gold, silver, copper, and platinum, can form noble metals, such as gold, silver, copper, and platinum, on a particle vacuum evaporation or by carrying out a spatter (publication number 11-1703). By having formed the noble-metals particle comes (publication number 10-339808) to show coloring

with a remarkable substrate. This coupling is produced by absorbing the light of some wavelength bands, in case the white light is reflected. Since it is dependent on a surface refractive index, the absorption peak wavelength of the above-mentioned noble-metals particle can be used as a principle which detects a reaction from which the refractive index in a front face changes (publication number 11-326193), and can be used as a biosensor by embellishing a front face with the biomolecule which has specific adsorption capacity, such as an antibody and DNA, (provisional publication of a patent 2000-55920). This patent application reduces the effect of the refractive index of a liquid to the above-mentioned biosensor as much as possible. When the refractive index of a liquid changes, it attains by irradiating at a specific include angle using the golden particle which has the property that absorption maximum wavelength does not change.

[0005]

[Embodiment of the Invention] (Example 1) One example of the use gestalt of this invention is shown in drawing 5. Gold with a thickness of 20nm is formed of vacuum evaporation on the silicon substrate 90. A gold grain 91 is formed on a polystyrene particle by carrying out chisel adsorption of the polystyrene particle with a particle size of 110nm further, and vapor-depositing 20 morenm of gold from on the. The golden particle 91 is embellished with the thiol molecule which has a functional group, and can combine the antibody of the arbitration which has an amino group. On the golden particle front face, since the required passage 92 is formed by PMMA in order to make the sample of a minute amount introduce and react, and the golden particle 91 is irradiated at the include angle of 35 degrees, the fiber bundle 93 is inserted at 35 include angles, and it is equipped with the polarizer 94 at the tip. In order to gather the specular reflection light 96 of the white exposure light 94, it is inserted fiber bundle 97. The specular reflection light 96 is led to a spectrophotometer, and the absorption-maximum wavelength of the reflected light is called for. Two or more fiber bundles may be arranged to an approach length or horizontally to the direction of passage.

(Example 2) One example of the use gestalt of this invention is shown in drawing. Gold with a thickness of 20nm is formed of vacuum evaporation on the glass substrate 100. A gold grain 101 is formed on a polystyrene particle by carrying out chisel adsorption of the polystyrene particle with a particle size of 80nm further, and vapor-depositing 10 morenm of gold from on the. The golden particle is embellished with the thiol molecule which has a functional group, and can combine the antibody of the arbitration which has an amino group. In order to make the sample of a minute amount introduce and react on a golden particle front face, required passage is formed with glass 102. The cylindrical lens 103 is arranged in the passage upper part, and the light 104 irradiated from the direction which are 55 include angles is condensed by the golden particle 101 through a polarizer 105. The specular reflection light 106 is led to a spectrophotometer, and absorption-maximum wavelength is called for.

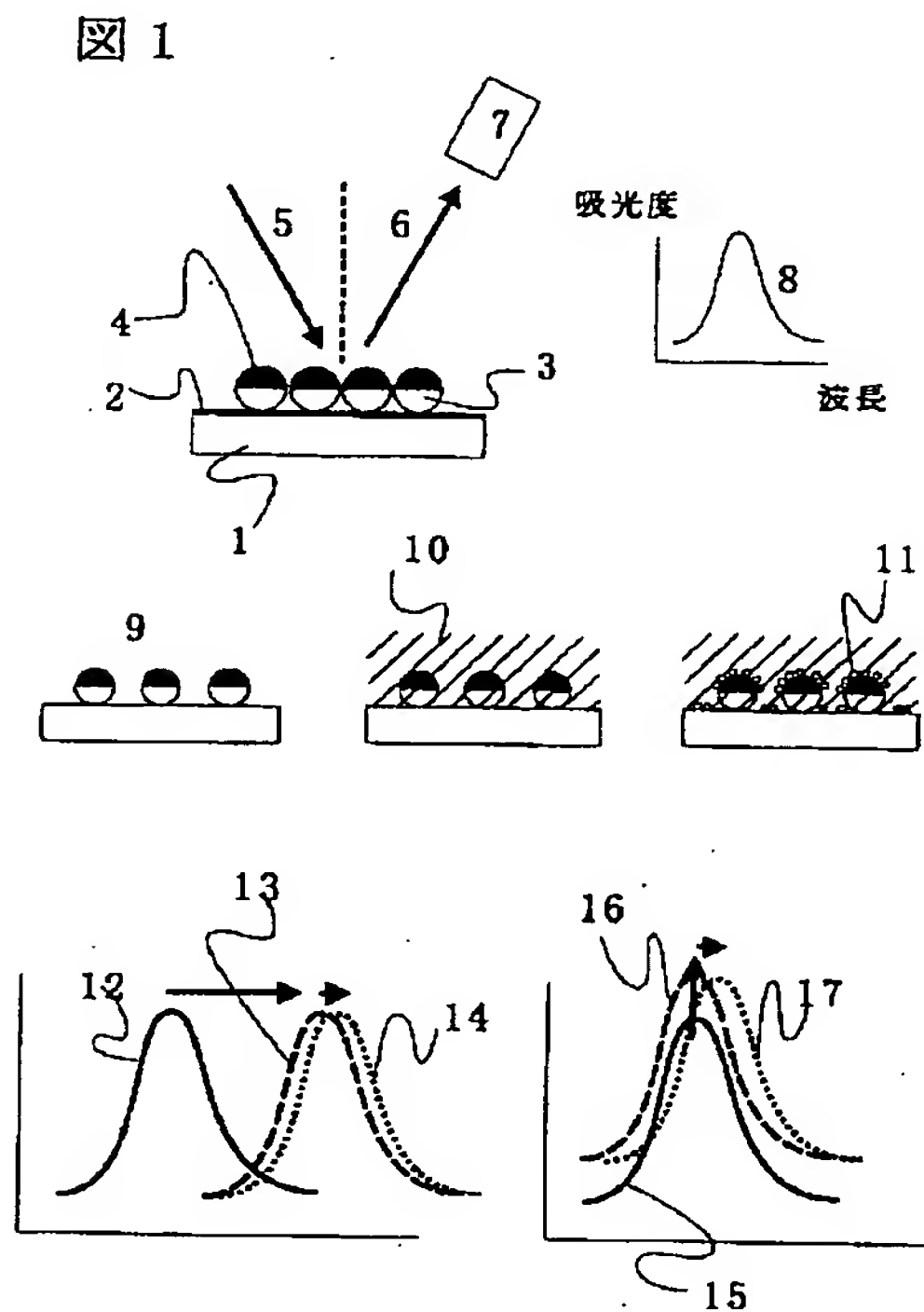
(Example 3) One example of the use gestalt of this invention is shown in drawing. Gold with a thickness of 20nm is formed of vacuum evaporation on the silicon substrate 110. A gold grain 112 is formed on a polystyrene particle by carrying out chisel adsorption of the polystyrene particle with a particle size of 135nm further in the hollow 111 on a silicon substrate 110, and vapor-depositing 10 morenm of gold from on the. The golden particle is embellished with the thiol molecule which has a functional group, and can combine the antibody of the arbitration which has an amino group. In order to make the sample of a minute amount introduce and react on a golden particle front face, required passage is formed with silicon 113. The reflecting mirror 114 is formed in the upper part of the field in which the golden particle is formed, and the light 117 introduced in passage through the optical fiber 115 and the polarizer 116 is reflected in the golden particle 112 by the reflecting mirror 114 at the include angle of 45 degrees. It is again reflected by the reflecting mirror 114, the specular reflection light 118 is led to a spectrophotometer through an optical fiber 119, and absorption-maximum wavelength is called for.

[0006]

[Effect of the Invention] By this invention, the simple sensor and detection equipment which can detect the existence of analyte by high sensitivity have been offered.

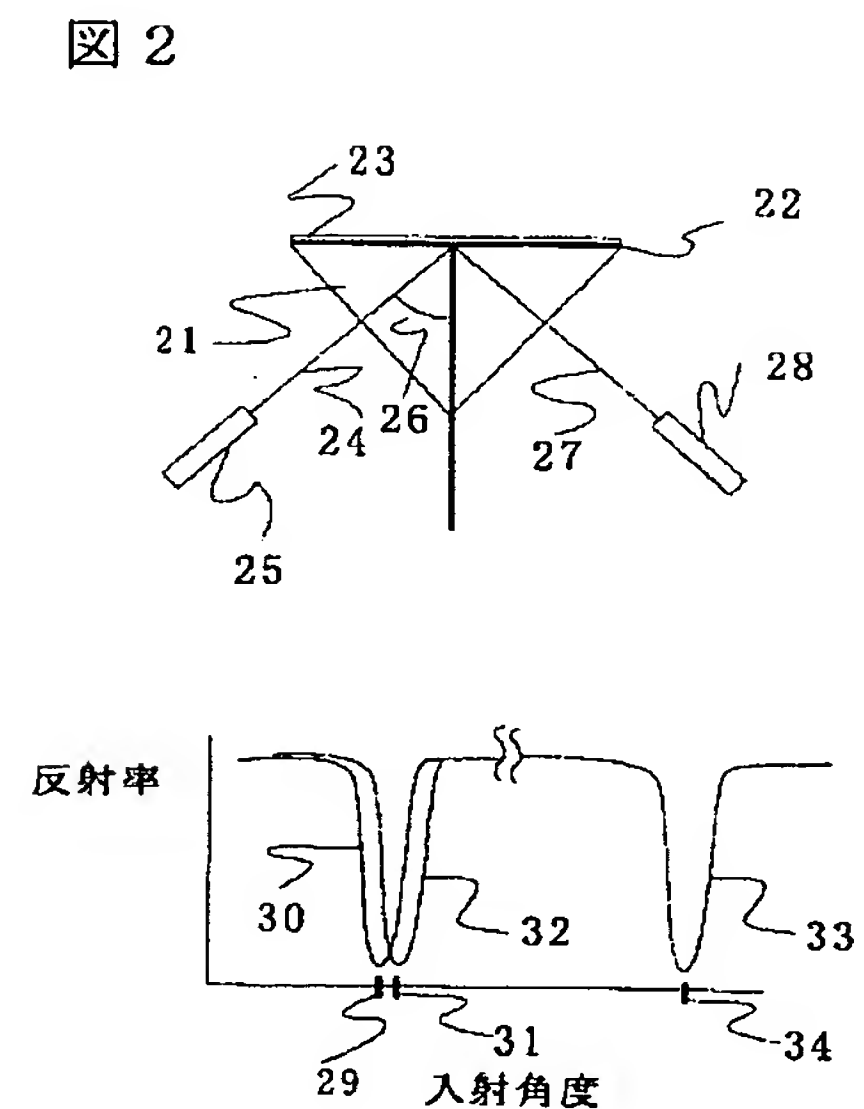
スペクトル、21：高屈折率担体、22：自由電子金属の薄膜、23：分子認識層、24：単色の平行光、25：光源、26：共鳴入射角度、27：正反射光、28：検出器、29：共鳴入射角度、30：入射角度依存性の反射光強度、31：分子吸着に伴って生じた新たな共鳴入射角度、32：反射光強度、33：反射光強度、34：液体の影響により生じた新たな共鳴入射角度、40：空気中における吸収スペクトル、41：エタノール中における吸収スペクトル、42：エタノール中におけるオクタデカンチオール自己組織化膜形成後の吸収スペクトル、43：空気中における吸収スペクトル、44：エタノール中におけるオクタデカンチオール自己組織化膜形成後の吸収スペクトル、60：微細流路、61：貴金属微粒子、62：マルチモード光ファイバー、63：白色光、64：偏光子、65：正反射光、66：マルチ

【図1】



モード光ファイバー、67：従来型表面プラズモン共鳴センサの応答特性、68：本発明によるセンサの応答特性、69：緩衝液Bによる置換、70：緩衝液B'による置換、71：第二の置換後の応答、72：分子吸着による応答、90：シリコン基板、91：金微粒子、92：流路、93：ファイバーバンドル、94：白色照射、95：偏光子、96：正反射光、97：ファイバーバンドル、100：ガラス基板、101：金微粒子、102：ガラス流路、103：シリンドリカルレンズ、104：照射光、105：偏光子、106：正反射光、110：シリコン基板、111：窪み、112：金微粒子、113：シリコン流路、114：反射鏡、115：光ファイバー、116：偏光子、117：照射光、118：正反射光、119：光ファイバー。

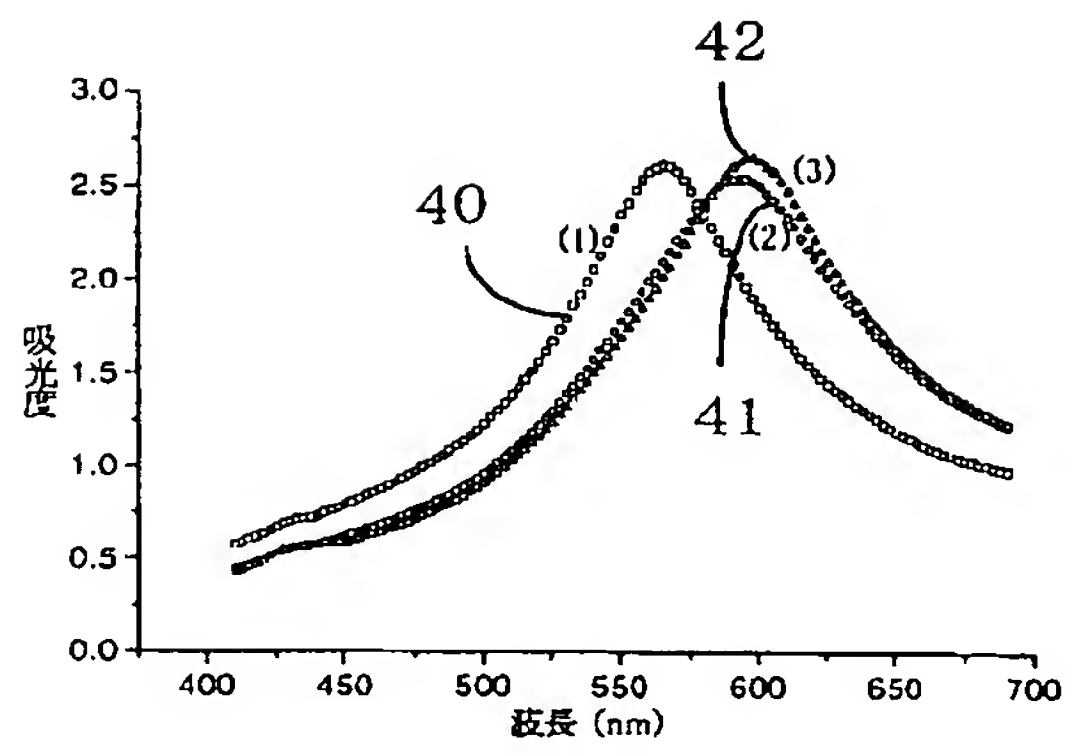
【図2】



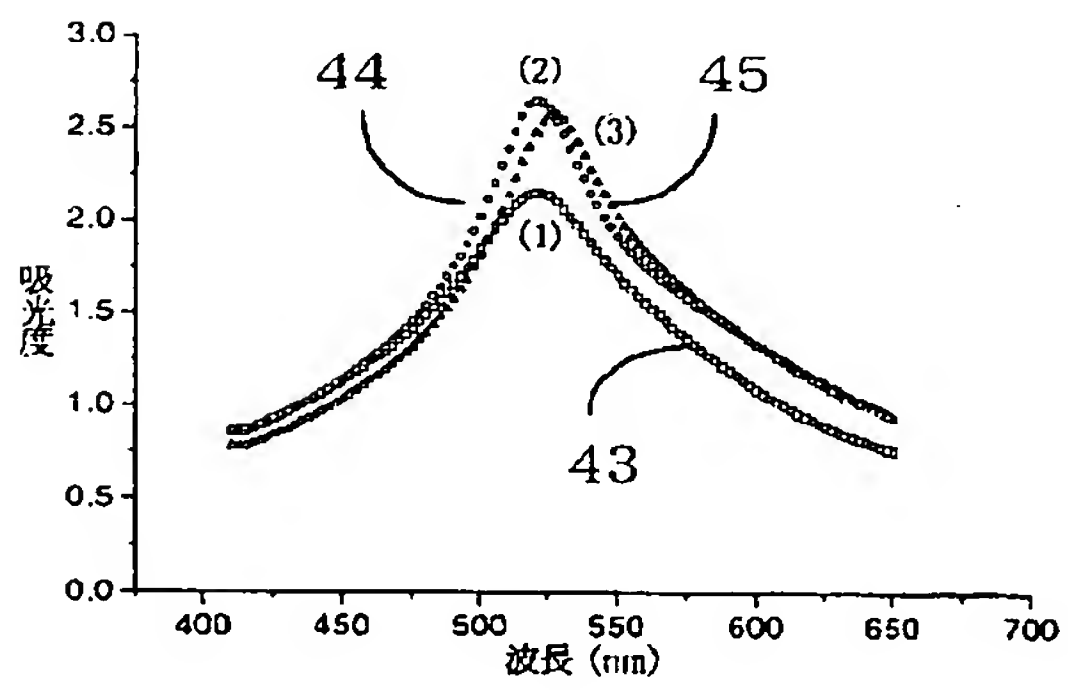
【図3】

図3

A

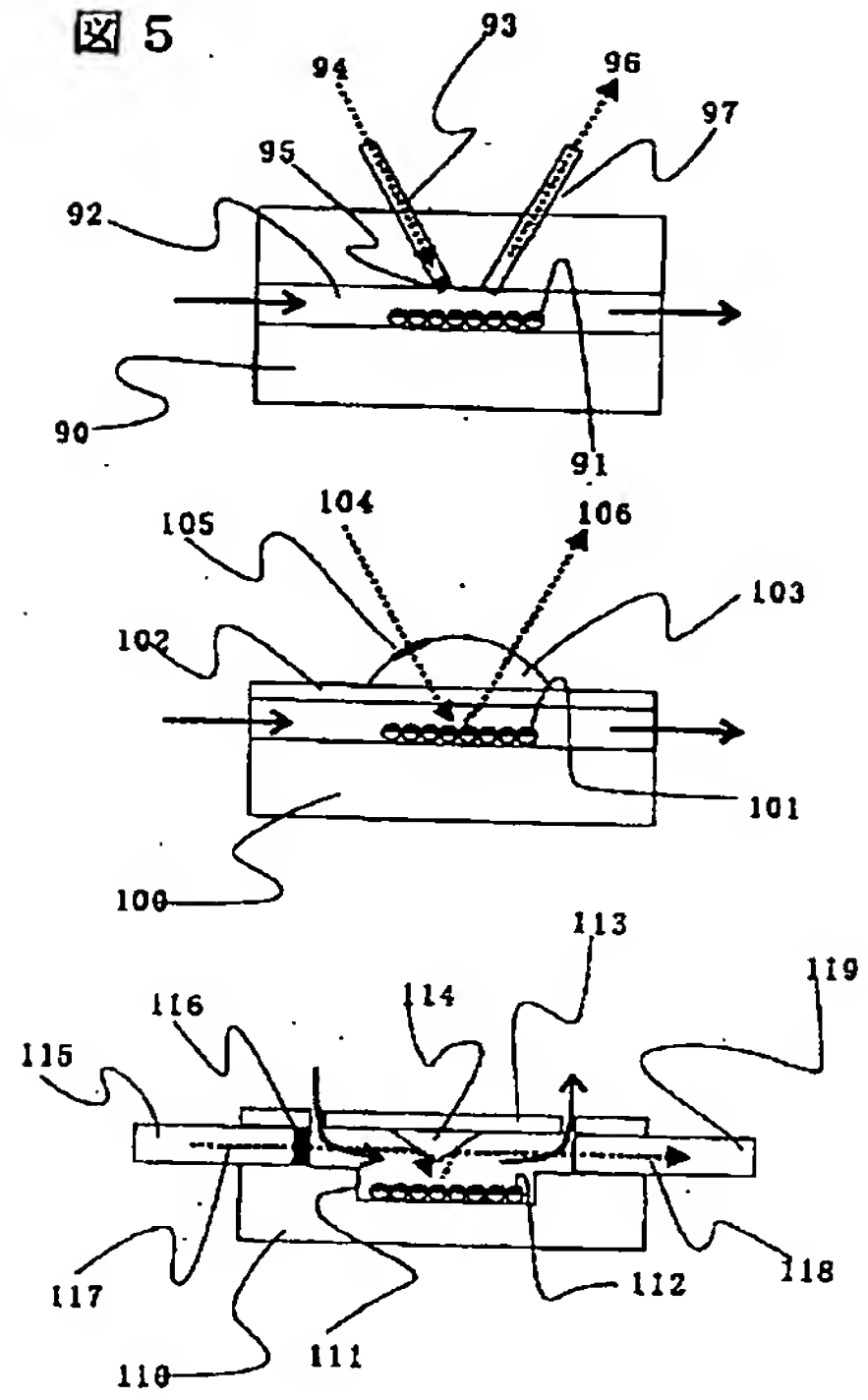


B



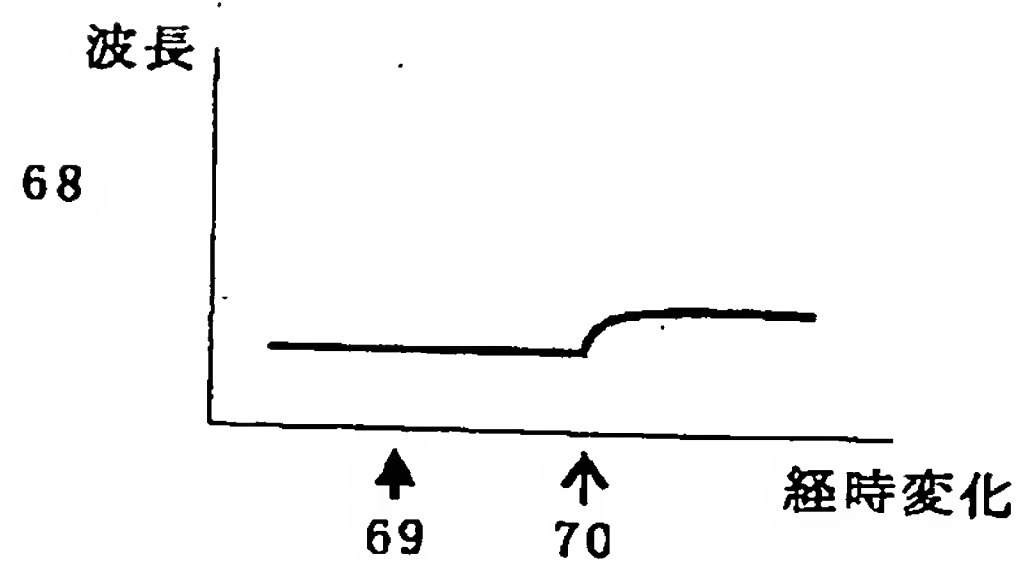
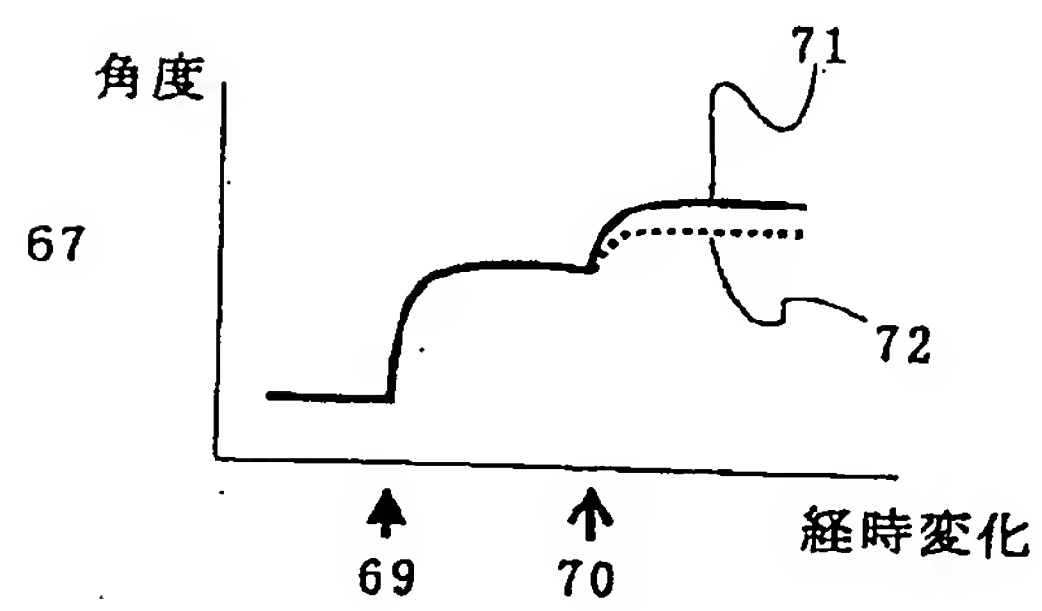
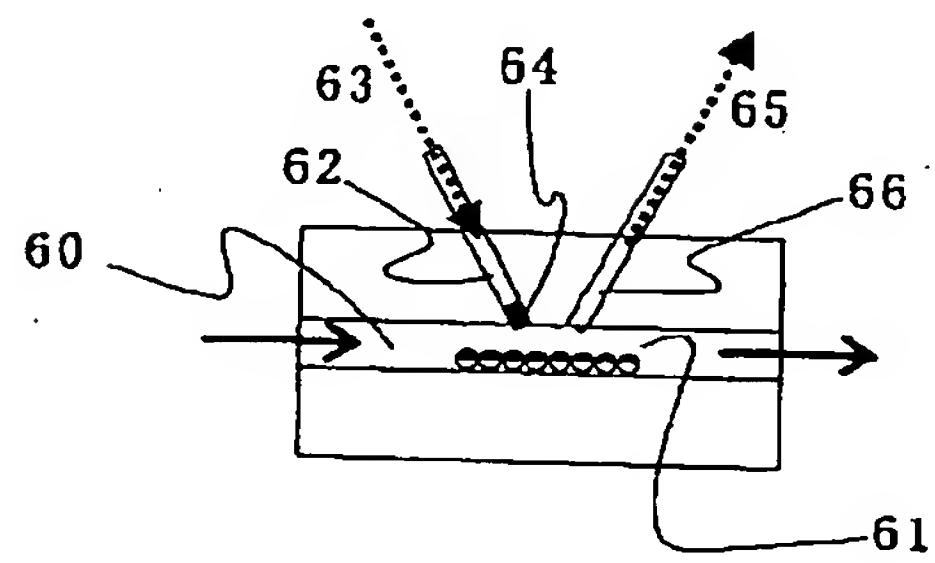
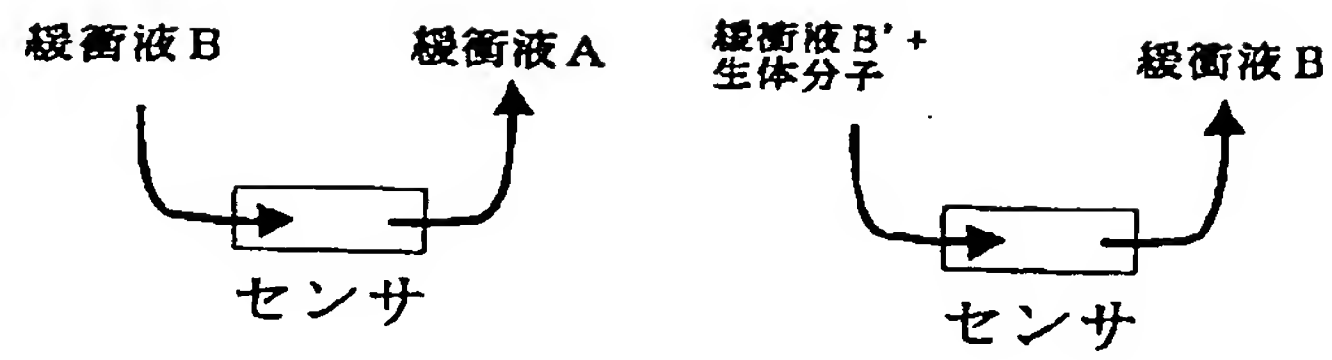
【図5】

図5



【図4】

図4



フロントページの続き

F ターム(参考) 2G045 FA11 FB15 GC11
2G059 AA05 BB12 CC16 CC17 DD12
DD13 EE02 EE05 EE12 GG10
HH02 JJ11 JJ12 JJ13 JJ17
JJ19

/